

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. März 2003 (20.03.2003)

PCT

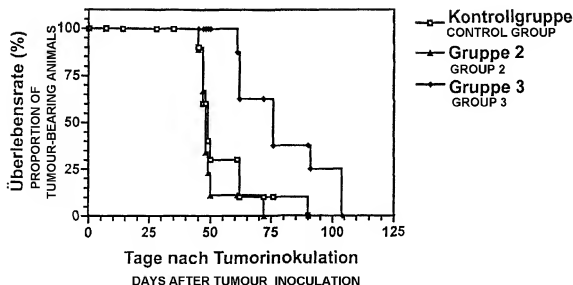
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/022883 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/47
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09473
- (22) Internationales Anmeldedatum:
24. August 2002 (24.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 45 254,3 13. September 2001 (13.09.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESellschaft GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Str. 3a, 91056 Erlangen (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRMANN, Martin [DE/DE]; Würzburger Weg 4, 91077 Neunkirchen (DE). BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, 91056 Erlangen (DE). KALDEN, Joachim, R. [DE/DE]; Loewenichstr. 19, 91054 Erlangen (DE). VOLL, Reinhard, E. [DE/DE]; An der Brettlg 4, 91330 Eggolsheim (DE). MANFREDI, Angelo [IT/IT]; Via Palestrina 4, I-20124 Mailand (IT). KOLOWOS, Wasilis [DE/DE]; Bergstr. 25, 97795 Schöndra (DE). REISER, Christian [DE/DE]; Steinertstr. 9, 96047 Bamberg (DE). WOITH, Walter [DE/DE]; Würzburger Ring 50, 91056 Erlangen (DE).
- (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49a, 91052 Erlangen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USE OF PROTEINS FOR THE PRODUCTION OF A MEDICAMENT FOR STIMULATING THE INNATE NON SPECIFIC IMMUNE SYSTEM

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES PROTEINS ZUR HERSTELLUNG EINES MEDIKAMENTS ZUR STIMULIERUNG DES ANGEBORENEN UNSPEZIFISCHEN IMMUNSYSTEMS



(57) Abstract: The invention relates to the use of a protein for producing a medicament for stimulating an innate non specific immune system, wherein the protein contains a) an annexin V or a largely similar molecule thereto or b) an active fragment of annexin V or a largely similar molecule thereto.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems, wobei das Protein a) ein Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül oder b) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls umfasst.



WO 03/022883 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems

- 5 Die Erfindung betrifft eine Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines Medikaments und ein Medikament zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Sie betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des Medikaments.
- 10 Der pathologische Zelltod, die Nekrose, ist mit einem Anschwellen der Zellorganellen und der Zelle selbst verbunden. Die Zytoplasmamembran wird durchlässig und die Zellinhaltsstoffe werden freigesetzt. Im Gegensatz dazu bleibt beim programmierten Zelltod, der Apoptose, die Zellmembran zunächst erhalten. Die Zellen werden beseitigt, bevor deren möglicherweise gefährlicher Inhalt in die Umgebung abgegeben wird. Die Zellen unterliegen dabei in einem frühen Apoptosestadium Oberflächenänderungen, beispielsweise einer Modifizierung der Kohlenhydrate und der Exposition anionischer
- 20 Phospholipide, insbesondere von Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Zytoplasmamembran. Letzteres wird durch die Herabregulierung der ATP-abhängigen Aminophospholipid-Translokase verursacht, welche Aminophospholipide von der Außenseite zu der Innenseite der Membran spezifisch transportiert. Außerdem wird eine als Scramblase bezeichnete, nicht-spezifische Lipid-Flipsite aktiviert, was zu einer Beschleunigung des Phosphatidylserin-Flip-Flop-Mechanismus führt. Auf der Außenseite der Zytoplasmamembran befindliches Phosphatidylserin dient als Erkennungssignal für die Beseitigung apoptotischer Zellen.
- 30

Es ist bekannt, dass die Präinkubation apoptotischer Lymphozyten mit Annexin V (AxV) die Aufnahme apoptotischer Zellen durch murine Peritonealmakrophagen, Makrophagen der J774-Zelllinie der Maus und Knochenmarks-Makrophagen wirksam block-

35

kiert (Krahling, S., et al., Cell Death Differ. 6 (1999), 183-189). Außerdem führt Annexin V im Allgemeinen zu starker Inhibition der Aufnahme apoptotischer Zellen sowohl durch aktivierte als auch nicht-aktivierte Makrophagen. Infolge
5 seiner Ca^{2+} -Kanalaktivität verlangsamt Annexin V überdies die Apoptose in CEM-Zellen.

Die Beseitigung apoptotischer Zellen induziert normalerweise weder eine Entzündung noch eine Immunantwort. In direktem
10 Kontakt mit Plasma können apoptotische Zellen prokoagulatorische und unter bestimmten Bedingungen pro-inflammatorische Effekte hervorrufen. Auf Monocyten/Makrophagen dominieren jedoch normalerweise immunomodulierende Effekte von apoptotischen Zellen durch die Wechselwirkung der apoptotischen Zellen über Thrombospondin mit CD36 auf Phagozyten.
15

Lektin-artige Moleküle, wie der Vitronectin-Rezeptor (CD51/CD61), Thrombospondin, CD36 und CD14, sind Rezeptoren, die Oberflächenänderungen auf apoptotischen Zellen erkennen.
20 CD14 scheint für die Phagozytose von Lymphozyten und lipidsymmetrischen Erythrozyten bei aktivierten und nicht-aktivierten Makrophagen erforderlich zu sein.

Die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen
25 wird stereospezifisch durch Phosphatidyl-L-serin-Liposomen gehemmt. Ein für die Erkennung des Phosphatidyl-L-serins verantwortlicher Rezeptor wird durch Antikörper definiert, die durch Immunisierung mit TGF- β - und β -Glucan-stimulierte Makrophagen hervorgerufen wurden (Fadok, V.A, et al., Nature
30 405(6782) (2000), 85-90). Weitere für diese Erkennung apoptotischer Zellen wichtige Rezeptoren sind u.a. die Scavenger-Rezeptoren, der LPS-Rezeptor CD14, der Thrombospondin-Rezeptor CD36, der Vitronectin-Rezeptor CD51/CD61, die Komplementrezeptoren und das Makrosialin CD68. Außerdem können
35 Pentraxine, Kollektine, unterschiedliche Komplementfaktoren,

β 2-Glycoprotein, die Annexine und Gas-6 als Adaptorproteine dienen.

Es ist weiterhin bekannt, dass Mäuse, denen apoptotische menschliche T-Zellen injiziert wurden, im Vergleich zu Kontrollmäusen, denen lebensfähige Zellen injiziert wurden, signifikant verringerte humorale Antworten gegen T-Zellen zeigten (Ponner, B. B., et al., Scand. J. Immunol. 47 (1998), 343-347). Es wurde auch beobachtet, dass eine Immunisierung mit apoptotischen Krebszellen drastisch verringerte zytotoxische T-Zell-Antworten im Vergleich mit lebenden wachstumsblockierten Zellen induzierte (Ronchetti, A., et al., J. Immunol. 163 (1999), 130-136). Das zeigt, dass die Engulfmentphagozytose apoptotischer Zellen nicht zu einer effizienten Antigenpräsentation und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten führt. Es ist möglich, dass eine schnelle Engulfmentphagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen und deren anti-inflammatorische Antwort die Aufnahme und effiziente Präsentation von aus apoptotischen Zellen stammenden Antigenen durch dendritische Zellen verhindert. Zusammen mit einer Produktion von Interleukin-10 (IL-10) durch Monocyten/Makrophagen nach Kontakt mit apoptotischen Zellen können diese Erkenntnisse die schlechte Effizienz von Krebsvakzinen, die apoptotische Zellen enthalten, erklären.

Aus Stach C. M. et al., Cell Death and Differentiation (2000) 7, 911-915 ist es bekannt, dass Annexin V die humorale Immunantwort stimuliert. Über eine Stimulierung der zellulären Immunantwort oder des angeborenen unspezifischen Immunsystems enthält dieser Artikel keine Angaben.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere eine Verwendung und ein Medikament gegen Tumore, Viren, Bakterien

und Parasiten angegeben werden. Ferner soll ein Verfahren zur Herstellung des Medikaments angegeben werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 14 und 22 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 13, 15 bis 21 und 23 bis 33.

Nach Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems vorgesehen, wobei das Protein

a) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül
oder

b) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls umfasst.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass die Verwendung des erfindungsgemäßen Proteins zu einer pro-inflammatorischen Antwort der Monocyten oder Makrophagen und damit zu einer Erhöhung der zellulären Immunität führt. Das beanspruchte Protein eignet sich hervorragend zur Bekämpfung von Tumoren, Viren, Bakterien und Parasiten.

Die Wirkung des erfindungsgemäßen Proteins beruht offensichtlich darauf, dass apoptotische Zellen durch eine Beladung mit Annexin V so verändert werden, dass sie in der Lage sind, das angeborene unspezifische Immunsystem, insbesondere natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen, zu aktivieren. Ferner wird durch die Verabreichung von Annexin V die wirksame Konzentration des Monokin TNF- α erhöht. Das Monokin TNF- α ist besonders wichtig für die Rekrutierung von NK-Zellen in das

Peritoneum (Smyth, M. J. et al., 1998, J. Exp. Med. 9:1611-1619). Ferner wird die Wirkung des erfindungsgemäßen Proteins insbesondere auch darauf zurückgeführt, dass es an Phosphatidylserin bindet und dessen anti-inflammatorische Potenz inhibiert. Diese Funktion des Proteins wird nicht nur erfüllt, wenn es sich um Annexin V handelt. Sie wird auch dann erfüllt, wenn das Protein lediglich ein mit Annexin V ähnliches Molekül oder ein wirksames Fragment von Annexin V oder ein mit dem Fragment weitgehend ähnliches Molekül umfasst. - Ein Fragment ist insbesondere dann "wirksam", wenn es an Phosphatidylserin bindet und zur Stimulierung einer pro-inflammatorischen zellulären Immunantwort beiträgt. Unter dem Begriff "ähnliche Moleküle" werden solche Moleküle verstanden, welche insbesondere an Phosphatidylserin binden und zu einem gewissen Grad eine Identität mit Annexin V aufweisen.

Nach einer Ausgestaltung kann eine Aminosäuresequenz des Proteins der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entsprechen oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zumindest zu 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit sein. Die Ermittlung der Identität kann erfolgen z.B. nach dem Verfahren von Altschul, S. F. et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Unter dem Begriff "Identität" wird vorliegend das Ausmaß verstanden, zu welchem zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen invariant sind.

Bei der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 2 handelt es sich um eine N-terminale Deletionsmutante der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1, der die acht Aminosäuren 3 bis 10, das heißt die Aminosäuren Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr fehlen.

Zweckmäßigerweise ist das Annexin V nicht-humanes Annexin V, vorzugsweise das Annexin V des Huhns. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Annexin V des Huhns mit menschlichem Annexin V ergibt, dass beide Proteine zu 78,2 % identisch sind.

5 Das Annexin V des Huhnes besitzt einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,60, während menschliches Annexin V einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 4,94 aufweist. Die Sequenz des menschlichen Annexins kann unter der Zugriffsnummer PO8756 in der Protein Datenbank "SWISS-PROT" abgerufen werden. Beide Annexine sind im Tiermodell immunogen.

15 Die Stimulierung der Immunantwort kann durch eine Blockade, Verhüllung, Maskierung und/oder Entfernung von extrazellulärem membranständig lokalisierten Phosphatidylserin bewirkt werden. Damit kann das Protein zweckmäßigerweise zur Bekämpfung von Bakterien, Viren, Parasiten oder Tumoren verwendet werden. Bevorzugterweise wird das Protein als Adjuvans verwendet. Es kann in diesem Zusammenhang vorzugsweise in der Tumorthherapie, für Tumorstoffe, in der Virustherapie, insbesondere zur Behandlung von Retrovirusinfektionen, Lentivirusinfektionen, Infektionen mit *Treponema pallidum*, dem Sindbisvirus, *Trypanosoma brucei* und HIV-Infektionen und zur Behandlung der Malaria sowie in der Malariaimmunisierung verwendet werden.

25 Das Medikament kann neben dem Wirkstoff weiterhin menschliche Tumorzellen umfassen, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen sein können. Die Apoptose und/oder Nekrose der Tumorzellen kann dabei spontan aufgetreten oder induziert worden sein. Als Induktoren für die Apoptose und/oder Nekrose kommen Bestrahlung der Tumorzellen ex vivo oder in-vivo oder ein Inkontaktbringen der Tumorzellen mit Zytostatika in Betracht. Es eignen sich in diesem Zusammenhang insbesondere Chemikalien wie H_2O_2 oder Staurosporin, 35 Medikamente wie Kortikosteroide, Chemotherapeutika wie Dox-

orubicin, cis-Platin oder Hydroxy-Harnstoff, UVB- und UVC-Strahlung, sowie β -, γ - oder Röntgenstrahlung. Vorzugsweise werden die apoptotischen und/oder nekrotischen Tumorzellen mit dem Wirkstoff in Kontakt gebracht.

5

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems mit einem Protein vorgesehen, welches

10 a1) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül
oder

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit
15 weitgehend ähnlichen Moleküls und

bb) apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen wird auf die vorhergehende Beschreibung verwiesen. Die darin erwähnten Merkmale
20 können sinngemäß auch Ausgestaltungen des Medikaments sein.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Medikaments vorgesehen, wo-
25 bei apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen in Kontakt gebracht werden mit einem Protein, welches

a) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül
30 oder

b) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls umfasst.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen wird wiederum auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die dort angegebenen Merkmale können auch zur Ausgestaltung des Verfahrens herangezogen werden.

5

Das in diesem Verfahren verwendete Protein wird vorzugsweise durch Expression mittels transformierter Stämme von *Escherichia coli* und anschließende Reinigung hergestellt. Vorzugsweise wird der Stamm *Escherichia coli* BL21 (DE3) eingesetzt.

10

Der verwendete Stamm von *Escherichia coli* kann mit einem Expressionsplasmid transformiert werden, der zur Expression von Annexin V des Huhnes oder eines wirksamen Fragmentes davon fähig ist. Beispielsweise ist das Expressionsplasmid pDJ2-AnXV, das neben dem Annexin V des Huhnes exprimierenden Gen

15

einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor und eine Antibiotikum-Resistenz-Kassette enthält. Als Antibiotikum zur Trennung der nicht-transformierten Bakterien von den transformierten Bakterien wird vorzugsweise Kanamycin verwendet.

20

Die unter Verwendung der transformierten Stämme von *Escherichia coli* erhaltenen Zellen, die nach einer Kultur in einem Nährmedium Annexin V des Huhnes enthalten, werden in einem Puffer aufgeschlossen. Die dabei erhaltene Lösung, die das Annexin V des Huhnes enthält, wird mittels Säulenchromatogra-

25

phie gereinigt, wobei ein Salz-Gradient, zweckmäßigerweise ein Natriumchlorid-Gradient, verwendet wird. Der Wirkstoff wird dabei mit einer Reinheit erhalten, die 95 % übersteigt.

30

Die Eignung von Annexin V des Huhnes oder eines wirksamen Fragmentes davon als Wirkstoff beruht auf der Feststellung, dass die Maskierung von Phosphatidylserin mit diesem Wirkstoff zu einer pro-inflammatorischen Wirkung apoptotischer und/oder nekrotischer Zellen führt und somit die zelluläre Immunantwort gegen apoptotische Zellen fördert. Annexin V des

35

Huhnes erhöht die Immunogenität von autologen bzw. syngen

apoptotischen Zellen deutlich. Es ist deshalb geeignet, die Effizienz von Vakzinen, die apoptotische Zellen enthalten, zu erhöhen. Das ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn die Zellen vor einer Injektion der Vakzine bestrahlt worden sind.

- 5 Ohne die Verwendung des Wirkstoffes Annexin V des Huhnes ist die Immunogenität dieser Zellen gering, da die Aufnahme apoptotischer Zellen eine anti-inflammatorische Reaktion menschlicher Monocyten/Makrophagen bewirkt. Durch die Behandlung der Zellen mit Annexin V des Huhnes wird diese anti-inflam-
- 10 torische Wirkung apoptotischer und/oder nekrotischer Zellen reduziert und so deren Immunogenität deutlich erhöht.

- Mit dem erfindungsgemäßen Protein kann der anti-inflammatorische Effekt phosphatidylserin-exponierender Zellen blockiert werden. Des Weiteren kann das Protein eine Immunstimulation durch Blockade, Verhüllung, Maskierung und/oder Entfernung von extrazellulärem, vorzugsweise membranständig lokalisiertem Phosphatidylserin bewirken. Das Protein kann deshalb als Modulator einer zellulären Immunantwort verwendet
- 20 werden.

- Ein wichtiges Einsatzgebiet für die Blockade der anti-inflammatorischen Wirkungen phosphatidylserin-exponierender Zellen ergibt sich aus der daraus resultierenden spezifischen "Adjuvanswirkung". Phosphatidylserin tragende Zellen werden nach
- 25 der Blockade des anti-inflammatorischen Wirkprinzips über einen pro-inflammatorischen, immunstimulatorischen Alternativweg prozessiert, der zu einer massiv erhöhten Immunantwort führt. Für diese "Adjuvanswirkung" ergeben sich die unterschiedlichsten Anwendungsgebiete, z.B. in der Humanmedizin. Zum einen kann dadurch die Immunogenität von Tumorstoffen gesteigert werden, wenn diese aus bestrahlten und somit größ-
- 30 tenteils apoptotischen Tumorzellen bestehen. Weiterhin ist es möglich, eine zelluläre Immunantwort gegen solche Tumorzellen zu erzielen, die aus therapeutischen Gründen zytostatisch be-
- 35

- handelt oder in situ radioaktiv bestrahlt worden sind. In diesem Fall würde eine tumorspezifische zelluläre Immunantwort bei der Beseitigung der Resttumormasse den Therapieerfolg steigern. Auch bei der Behandlung von Virusinfektionen, z.B. von behüllten Viren, die Phosphatidylserin exponieren, führt die Blockade des phosphatidylserinabhängigen anti-inflammatorischen Effekts zu einer spezifischen Immunstimulation. Als besonders wichtiges Beispiel in diesem Zusammenhang muss die Behandlung der Infektionen mit Lentiviren und HIV angesehen werden. Ein von der Zelle "unbemerkt" phosphatidylserinabhängiges Eindringen der Viren führt zur Viruspersistenz im langlebigen Monocyten/Makrophagen-Pool. Die Viruspersistenz führt bei den allermeisten Infizierten nach einer mehr oder minder langen Latenzzeit zum Tode. Annexin V des Huhns ist für die Behandlung von HIV-Infizierten geeignet, da inflammatorisch phagozytiertes apoptotisches Material in den Phagozyten einen "respiratory burst" auslöst und so zur Zerstörung der Virengenome führt.
- Ähnliches gilt auch für die Behandlung von Infektionen mit Phosphatidylserin-exponierenden Bakterien (z.B. *Treponema pallidum*) oder von Infektionen und parasitären Erkrankungen, die zur Exposition von Phosphatidylserin auf infizierten Wirtszellen führen (z.B. *Sindbisvirus*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*).

Die Erfindung wird nachstehend anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 die Expressionskinetik von Annexin V des Huhns in transformierten *Escherichia Coli* BL21 (DE3) anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese,
- Fig. 2 eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Annexin V des

Huhns aus transformierten Escherichia Coli BL21 (DE3),

- 5 Fig. 3 Verhältnisse der sekretierten Zytokine in Abhängigkeit von der Inkubation muriner Peritonealmakrophagen mit radioaktiv bestrahlten Tumorzellen, die vorher mit Annexin V des Huhns oder nicht mit Annexin V behandelt worden waren,
- 10 Fig. 4a den Anteil tumorfreier Tiere in Abhängigkeit von der Zeit und der Injektion unterschiedlicher Mengen bestrahlter Tumorzellen, die nach der Bestrahlung mit oder ohne Annexin V des Huhns behandelt worden waren, wobei die Tiere vor der Injektion lebender
- 15 Tumorzellen behandelt worden sind,
- Fig. 4b den Anteil tumorfreier Tiere in Abhängigkeit von der Zeit und der Injektion bestrahlter Tumorzellen, die nach der Bestrahlung mit oder ohne Annexin V
- 20 des Huhns behandelt worden waren, wobei den Tieren vor der Behandlung lebende Tumorzellen injiziert wurden,
- Fig. 5a Tumor-Latenz von den Mäusen, die den Tumor nicht abgestoßen haben, in Abhängigkeit der Dosis bestrahlter Tumorzellen und der Gabe an Annexin V und
- 25
- Fig. 5b Überleben von Mäusen, die den Tumor nicht abgestoßen haben, in Abhängigkeit von der Dosis bestrahlter Tumorzellen und der Gabe an Annexin V,
- 30
- Fig. 6 den Anteil der tumortragenden Tiere in Abhängigkeit der Dauer nach der Tumordinokulation,

- Fig. 7 die Überlebensrate in Abhängigkeit der Dauer nach der Tumorinokulation,
- Fig. 8 die [^3H]-Thymidin-Aufnahme von INA6 TU1-Zellen über der AxV-Konzentration und
- Fig. 9 tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse der untersuchten Tiergruppen.

10 A. Expression und Reinigung von Annexin V des Huhns

A1. Expression von Annexin V des Huhns

Zur Expression von Annexin V des Huhns (cAnxV) wurde als Expressionsplasmid pDJ2-AnxV verwendet, das neben dem cAnxV kodierenden Gen einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette enthält. E.coli BL21 (DE3) wurde mit dem Expressionsplasmid transformiert und Expressionskinetiken durchgeführt. Dabei wurde 2xYT mit 50 mg/l Kanamycin als Nährmedium eingesetzt.

Für die Herstellung von cAnxV wurde eine 100 ml Vorkultur mit frisch transformierten E. coli BL21 (DE3) angeimpft und 8 h bei 37°C geschüttelt. 5 l Hauptkultur wurden mit 5 ml der Vorkultur versetzt und 16 bis 20 h bei 37°C geschüttelt. Auf einen Zusatz von IPTG wurde verzichtet, da in diesem Fall mit und ohne Induktion gleiche Expressionsausbeuten erzielt wurden. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellfeuchtmasse betrug 16 bis 21 g. Die Expressionskinetik ist in Fig. 1 dargestellt. Die Expressionskinetiken ergaben, dass sich E. coli BL21 (DE3) auch ohne Induktion mit IPTG für eine Expression von cAnxV in dem eingesetzten Medium eignet.

A2. Reinigung von Annexin V des Huhns

Die gemäß Ziff. 1 erhaltenen Zellen wurden in einem Puffer A1 (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA) resuspendiert und mittels
5 Hochdruck (Gaulin) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Aufschlusssuspension wurden durch hochtourige Zentrifugation entfernt. Der lösliche cAnxV-enhaltende Überstand wurde auf eine in Puffer A1 äquilibrierte Q-Sepharose-ff-Säule (Säule 1) (25 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen.

10 Die Elution des Zielproteins erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten. Die cAnxV-enhaltenden Fraktionen wurden zusammengefasst und gegen einen Puffer A2 (50 mM Na-Acetat pH 5,6) dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine in A2 äquilibrierte Resource-S-Säule (Säule 2) (6 ml, amersham pharmacia,
15 Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die vereinigten cAnxV-enhaltenden Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration (Pall Filtron, USA) konzentriert und auf eine in 10 mM Na-Phosphat pH 7,2, 140 mM NaCl äquilibrierte Superdex 200 pg-Säule (Säule 3) (amersham
20 pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Homogenes cAnxV wurde von der Säule eluiert. Aus 20 g Zellen (Feuchtmasse) wurden 30 mg cAnxV mit einer Reinheit, die 95 % überstieg, isoliert. Fig. 2 zeigt anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Ergebnisse der Reinigung unter Verwendung der Säulen 1 bis 3.

25 Alternativ kann anstelle der angegebenen Säulen für Säule 1 Q-Sepharose XL (amersham pharmacia, Freiburg), für Säule 2 SP-Sepharose HP (amersham pharmacia, Freiburg) und/oder für Säule 3 Sephacryl S200 HR (amersham pharmacia, Freiburg) verwendet werden.
30

Alternativ kann anstelle der mittels Säule 3 durchgeführten Größen-Ausschluss-Chromatografie (SEC) eine hydrophobe Säule eingesetzt werden. In diesem Fall werden die cAnxV-enhaltenden Fraktionen, die von Säule 2 eluieren, vereinigt und
35

mit festem Ammoniumsulfat auf 1,5 M aufgestockt. Die Proteinlösung wird auf eine Phenylsepharose 6B-Säule (15 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen Gradienten von 1,5 bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert.

5

B. Immunisierung von Mäusen mit Annexin V-behandelten, apoptotischen Tumorzellen

B1. Mäuse und Tumorzellen

10

Sechs bis acht Wochen alte, weibliche C57BL/6 Mäuse wurden in einer pathogenfreien Tierversuchsanlage gemäß den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft gehalten. Die syngene H-2b Lymphomlinie RMA wurde von Angelo A. Manfredi (Hospitale San Raffaele, 20132 Mailand, Italien) zur Verfügung gestellt. Die H-2b Melanom Zelllinie B16F1 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen. Die Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmeninfektion getestet

15

20 B2. Zelltod

RMA Zellen wurden wie bei Bellone, M., et al., J. Immunol. 159 (1997), 5391-5399 beschrieben mit ultraviolettem Licht bestrahlt, anschließend für 1 h bei 37°C mit 50 µg/ml Mitomycin C behandelt und gewaschen. Durch Färbung mit FITC-markiertem Annexin V (Bender MedSystems, Valter Occhiena, Torino, Italy) wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin verfolgt. Die Ionendichtigkeit der Plasmamembran wurde mit Hilfe von Propidiumiodid bestimmt. Die Zellen wurden 0, 3, 9 und 18 h nach Bestrahlung analysiert. Die Spezifität der Annexin V-Bindung wurde durch die Behandlung bestrahlter Zellen mit steigenden Konzentrationen (1500 mg/ml) von unmarkiertem Annexin V oder Rinderserumalbumin (BSA) und anschließender Bestimmung der verbliebenen Annexin V - Fluorescein-isothio-

25

30

cyanat Bindung mittels Durchflusszytometrie (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, USA) ermittelt.

B3. Makrophagen

5

Makrophagen wurden durch Anhaften an Kunststoff aus entzündlichen Peritoneallavagen, die durch Injektion von Thioglykolat induziert worden waren, isoliert (Fadok, V. A., et al., Nature 405 (2000), 85-90).

10

B4. Bestimmung der Zytokinfreisetzung von Makrophagen nach Co-Kultur mit bestrahlten Tumorzellen

Makrophagen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit bestrahlten Tumorzellen co-kultiviert. Im Kulturüberstand wurden mit Hilfe spezifischer kommerzieller ELISAs die Zytokine TNF-alpha, IL-1beta, IL-10 and TGF-beta gemessen (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN).

15

20 B5. Immunisierung und Heilung

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte durch subkutane (s.c.) Injektion in den Fußballen von 1, 5 oder 10×10^6 bestrahlten RMA Zellen. Die bestrahlten Zellen waren entweder ohne oder mit 100 µg/ml Hühner Annexin V für 20 min bei Raumtemperatur in einem Ca^{2+} -haltigen isotonen Puffer vorinkubiert worden. Am Tag 15 erhielten die Mäuse eine Boost-Injektion in die rechte Flanke. Am Tag 30 wurde die Effektivität der Immunisierung durch s.c. Injektion von $2,5 \times 10^4$ lebenden RMA Zellen in die gegenüberliegende Flanke getestet. Zwei Mal wöchentlich wurde dann durch Tasten überprüft, ob bei den Tieren Tumore angewachsen waren. Ein Tier wurde als tumorpositiv gewertet, wenn der Mittelwert der beiden senkrecht zueinander stehenden Durchmesser > 2 mm war. Wenn ein Tumor > 10 mm gewachsen war oder ulzerierte, wurden die befallenen Tiere ge-

25

30

35

tötet. Tiere, bei denen innerhalb von 10 Wochen nach der Injektion lebender RMA Zellen kein Tumor tastbar war, wurden als tumornegativ gewertet. Diesen tumorfreien Mäusen wurden abermals $2,5 \times 10^4$ lebende RMA Zellen in die gegenüberliegenden Flanke injiziert, um die Dauer des Schutzes zu überprüfen. Die Spezifität der Antitumorwirkung wurde in den geschützten Tieren durch s.c. Gabe von $2,5 \times 10^4$ syngen B16F1 Melanomzellen überprüft (Bellone, M., et al., J. Immunol. 158 (1997), 783-789). Zur Bestimmung des Effekts von Unterschieden bei der Behandlung von etablierten RMA Lymphomen wurden $2,5 \times 10^4$ lebende RMA Zellen s.c. in die linke Flanke injiziert. Nachdem der Tumor drei Tage lang angewachsen war, wurden die Tiere an der gegenüberliegenden Flanke mit 1 oder 5×10^6 bestrahlten RMA Zellen ohne oder mit Annexin V des Huhns behandelt (Eine Vakzinierung pro Woche über drei Wochen). Das Tumorstadium wurde bestimmt wie oben beschrieben.

B6. Ergebnis

Murine Peritonealmakrophagen sind mit unterschiedlichen Mengen radioaktiv bestrahlter Tumorzellen (bTZ) (syngene RMA-Tumorzellen) inkubiert worden, welche zuvor entweder mit Annexin V des Huhns oder nicht mit Annexin V des Huhns behandelt worden waren. Nach 24 h wurde der Kulturüberstand geerntet und die Freisetzung der Zytokine TNF-alpha, IL-1-beta, IL-10 and TGF-beta mit ELISAs gemessen. Die Fig. 3 zeigt die Ergebnisse der Versuche mit einem bTZ/Mph Ratio von 5 zu 1. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse bestrahlter Tumorzellen, die mit Annexin V des Huhns behandelt worden sind. Die weißen Balken zeigen die Ergebnisse bestrahlter Tumorzellen, die nicht mit Annexin V des Huhns behandelt worden sind. In der nachstehenden Tabelle 1 sind die Einzelwerte der Messungen noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 1

bTZ:Mph Ratio	1:1		5:1	
	bTZ	bTZ + AxV	bTZ	bTZ + AxV
TNF-alpha	257 +/-30	763 +/-66*	335 +/-30	978 +/-48**
IL-1-beta	n. d.	n. d.	44 +/-7	322 +/-85*
IL-10	97 +/-23	95 +/-4	105 +/-30	90 +/-8
TGF-beta	339 +/-39	145 +/-12	505 +/-54	193 +/-26*

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

5

Die Behandlung apoptotischer Zellen mit Annexin V des Huhns verschiebt das Zytokinmuster von Phagozyten in Richtung Inflammation.

- 10 Bestrahlte syngene Tumorzellen, die mit Annexin V vom Huhn behandelt worden sind schützen und heilen Mäuse, die eine letale Tumordosis injiziert bekommen hatten. Die Behandlung führt dabei zu einer langanhaltenden spezifischen Anti-Tumor-Immunität.

15

Die Fig. 4a und b zeigen jeweils den Anteil an tumorfreien Tieren in Abhängigkeit von der Zeit und der Injektion unterschiedlicher Mengen bestrahlter Tumorzellen (bTZ), die nach der Bestrahlung mit oder ohne Annexin V des Huhns inkubiert worden waren. Die in den Fig. 4a und b mit gefüllten Symbolen gezeigten Ergebnisse betreffen bestrahlte Zellen, die mit Annexin V des Huhns behandelt worden sind. Die weißen Symbolen betreffen Ergebnisse mit bestrahlten Zellen, welche ohne Annexin V des Huhns behandelt worden sind.

20

25 Die Fig. 4a zeigt Ergebnisse von Versuchen, bei denen Mäusen nach der Injektion mit bestrahlten Tumorzellen, die nach der Bestrahlung mit oder ohne Annexin V des Huhns inkubiert worden waren, lebende Tumorzellen injiziert wurden (Vakzinie-

rungsansatz). Die Injektion lebender Tumorzellen erfolgte am Tag 0 (1. Pfeil) und bei den überlebenden Tieren am Tag 72 (2. Pfeil).

- 5 C57Bl/6 Mäuse wurden zweimal nach folgendem Schema subkutan in die rechte Flanke injiziert:

mit PBS
mit 1×10^6 bestrahlten Tumorzellen (bTZ)
10 mit 5×10^6 bestrahlten Tumorzellen (bTZ)
mit 1×10^7 bestrahlten Tumorzellen (bTZ)

Am Tag 0, zwei Wochen nach der letzten Boosterinjektion, wurden $2,5 \times 10^4$ lebende RMA-Tumorzellen in die gegenüberliegenden linke Flanke der Mäuse injiziert. Am Tag 72 wurde die Injektion bei den überlebenden Tieren wiederholt (Pfeil). Die Fig. 4a zeigt, dass die Inkubation mit Annexin V des Huhns (schwarze Dreiecke) die Tumorabstoßung gegenüber der Injektion mit unbehandelten bestrahlten Tumorzellen (weiße Dreiecke)
15 in allen Gruppen deutlich steigert.
20

Um die Wirkung auf voretablierte Tumoren zu untersuchen wurden $2,5 \times 10^4$ lebende RMA-Tumorzellen subkutan in die linke Flanke von C57Bl/6 Mäusen injiziert. Jede Kohorte enthielt 10
25 Mäuse. Vier Tage später wurden entweder 1×10^6 oder 5×10^6 bestrahlte RMA-Tumorzellen in die rechte Flanke injiziert. Diese Injektion erfolgte nach Behandlung der bestrahlten Zellen mit (gefüllte Symbole) oder ohne (offene Symbole) Annexin V des Huhns. Die Fig. 4b zeigt den Zeitverlauf der tumorfreien Tiere. Bei der Injektion von 5×10^6 Tumorzellen steigert
30 die Behandlung der bestrahlten Tumorzellen mit Annexin V des Huhns deren Immunogenität und die daraus folgende Tumorabstoßung signifikant.

Wie in Fig. 5 gezeigt, waren bei den Mäusen, die nicht vollständig geschützt waren, sowohl die Tumor-Latenz (Fig. 5a), als auch die Überlebenszeit erhöht, wenn die bestrahlten Tumorzellen vor der Injektion mit Annexin V des Huhns behandelt
5 worden waren.

C. Daten von SCID-Mäusen

C1. Ziel

- 10 Bestimmung des Einflusses einer AxV-Behandlung apoptotischer Zellen auf das angeborenen unspezifische Immunsystem.

C2. Material und Methoden

15 C2.1. Zellen

- Die humane Plasmazelllinie INA-6 wurde aus einem Pleuraerguss eines achtzigjährigen Patienten mit Plasmazellenleukämie etabliert. Sie wächst als Einzelzellsuspension und zeigt die
20 Morphologie von Plasmablasten. Die Subzelllinie INA-6 Tu1 stammt aus einer Passage in SCID-Mäusen. Im Gegensatz zur Original-Zelllinie proliferiert INA-6 Tu1 unabhängig von Interleukin-6 und bildet nach intraperitonealer (i.p.) Injektion in SCID-Mäusen deutlich schneller tastbare Tumoren (Bur-
25 ger, R. et al. (2001) Hematol. J. 2: 42-53).

C2.2. Induktion von Apoptose in INA-6 Tu1-Zellen

- Die Erzeugung apoptotischer INA-6 Tu1-Zellen erfolgte durch
30 UV-Bestrahlung für 40 Sekunden und anschließende Weiterkultivierung für 12 Stunden. Bei dieser Dosis zeigen die Zellen eine Apoptoserate von ca. 90%, wobei eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis die Rate nur unwesentlich verändert.

C2.3. SCID-Mäuse

Für das Experiment wurden 30 weibliche, sechs Wochen alte SCID-Mäuse (Charles River Wiga GmbH) eingesetzt. Auf Grund
5 eines angeborenen Defekts besitzen die SCID-Mäuse kein funktionales spezifisches Immunsystem in Form reifer T- und B-Lymphocyten. Das unspezifische Immunsystem der Tiere ist jedoch unbeeinflusst. Zur Ausschaltung einer vorhandenen Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurden die
10 Tiere einer Ganzkörper-Gammabestrahlung mit einer individuellen Dosis von 2 Gy bestrahlt.

C2.4. Inokulation mit INA-6 Tu1

15 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden den Tieren je 2×10^7 vitale (Vitalitätsrate ca. 90%) INA-6 Tu1-Zellen in 1 ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit 20% fötalem Rinderserum) i.p. injiziert.

20 C2.5. Therapeutische Immunisierung

24 Stunden nach der Tumordinokulation wurden die Mäuse in drei gleich große Gruppen geteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten je 1 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i.p.
25 injiziert. Die Tiere der zweiten Gruppe erhielten je 1 ml HBSS mit 2×10^7 apoptotischen INA-6 Tu1-Zellen i.p. verabreicht. Die Tiere der dritten Gruppe schließlich erhielten je 1 ml HBSS mit 2×10^7 apoptotischen INA-6 Tu1-Zellen injiziert, wobei die Zellen 30 Minuten vor der i.p.-Gabe mit
30 100 µg Annexin V des Huhns bei Raumtemperatur inkubiert worden waren.

C2.6. Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Log-Rank-Test mit Hilfe des Softwarepakets SPSS 10.0.7 von SPSS
5 Inc.

C2.7. Ergänzendes Experiment

Um einen direkten toxischen Effekt von Annexin auf INA-6 Tul-
10 Zellen ausschließen zu können, wurde ein Proliferationstest durchgeführt. Hierzu wurden 10^4 INA-6 Tul-Zellen pro Näpfchen in Flachboden-Mikrotiterplatten mit 0,2 ml Medium (RPMI-1640 mit 10% fötalem Rinderserum und 2,5 ng/ml humanem rekombinantem Interleukin-6) und unterschiedlichen Mengen Annexin V
15 (6 pg/ml bis 50 µg/ml) über 72 Stunden inkubiert, wobei die Zellen in den letzten 6 Stunden mit 1 µCi [3 H]-Thymidin (Amersham) pro Näpfchen gepulst wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in einem β -Szintillationszähler analysiert. Die Werte in Fig. 8 zeigen den mittleren [3 H]-Thy-
20 midin-Einbau in cpm (counts per minute) aus Triplikaten mit der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Kurve zeigt eindeutig, dass Annexin V keinerlei Einfluss auf die Proliferation von INA-6 Tul-Zellen ausübt.

25 C3. Beobachtungen während der Tierstudie

48 Stunden nach der Tumordinokulation zeigten die Tiere der zweiten Gruppe, vor allem aber die Tiere der dritten Gruppe, starke allgemeine Krankheitszeichen wie struppiges Fell und
30 Gewichtsverlust, während die Tiere der Kontrollgruppe äußerlich gesund wirkten. Am dritten und am fünften Tag nach der Tumordinokulation ist je ein Tier der dritten Gruppe sowie am 18. Tag nach der Tumordinokulation ein Tier der zweiten Gruppe eingegangen. Die jeweilige Todesursache konnte nicht ermit-
35 telt werden. Es kann jedoch mit ziemlicher Sicherheit ausge-

schlossen werden, dass die Tiere zu diesem frühen Zeitpunkt an der induzierten Myelomerkrankung verstarben. Bei der Auswertung des Versuchs wurden daher aus der zweiten und dritten Gruppe nur die verbliebenen neun bzw. acht Tiere berücksichtigt. Tiere im finalen Krankheitsstadium wurden vor der weiteren Untersuchung getötet.

C4. Ergebnisse

- Am Tag 29 nach der Inokulation zeigten sieben der zehn Tiere der Kontrollgruppe erbsengroße Tumoren am Ort der Inokulation. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in der zweiten Gruppe gemacht, wo sieben von neun Tieren deutliche Tumorbildung zeigten. Überraschenderweise konnte bei keinem der acht Tiere, die mit Annexin V-beladenen apoptotischen INA-6 Tumorzellen behandelt worden waren (Gruppe 3), zu diesem Zeitpunkt ein Tumor festgestellt werden. Die Unterschiede der Daten bzgl. Tumorstadium zwischen der Gruppe 3 und der Gruppe 2 ($p=0,0001$) bzw. der Kontrollgruppe ($p=0,004$) sind statistisch signifikant (Fig.9, Tabelle).

- Die mittlere Überlebensdauer nach Tumordinokulation betrug in der Kontrollgruppe 54,8 Tage, während die Mäuse der zweiten Gruppe sogar eine leicht verkürzte Überlebensdauer von durchschnittlich 50,4 Tagen aufwiesen. Im Gegensatz dazu war die mittlere Überlebensdauer von sechs der acht Mäuse der dritten Gruppe mit 71,3 Tagen deutlich höher. Außerdem haben die restlichen zwei Tiere der dritten Gruppe das vorher festgelegte Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 95) um neun Tage überlebt. Tiere, bei denen Tumoren verzögert auftraten, zeigten in erster Linie Leberinfiltrate und Aszitesbildung, während die Geschwüre bei frühzeitigem Auftreten eher lokal begrenzt wuchsen. Die Unterschiede der Überlebensdaten zwischen der Gruppe 3 und der Gruppe 2 ($p=0,0004$) bzw. der Kontroll-

gruppe ($p=0,0095$) sind statistisch signifikant (Fig. 6, 7, Tabelle).

C5. Schlussfolgerungen

5

Die Beteiligung von nicht-spezifischen NK-Zellen neben auf spezifische Antigene gerichteten zytotoxischen T-Zellen an einer erfolgreichen Tumorabwehr ist allgemein bekannt.

- 10 Auf Grund eines genetischen Defekts besitzen SCID-Mäuse kein spezifisches Immunsystem, also auch keine funktionalen zytotoxischen T-Zellen. Sie sind jedoch in der Lage, mit Hilfe ihrer Makrophagen und NK-Zellen durch Stickstoffmonoxid-Metaboliten oder/und Perforin-vermittelte Zytotoxizität das Tumorm Wachstum zu unterbinden (Cifone, M.G., Ullisse, S., and Santoin, A. (2001) *Int Immunopharmacol* 1(8): 1513-1524).
- 15

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die therapeutische Gabe von Annexin-beladenen apoptotischen Zellen die Etablierung eines humanen Tumors in SCID-Mäusen deutliche hinauszögern und so die Überlebensdauer verlängern kann.

20

Offensichtlich werden apoptotische Zellen durch die Annexin-Beladung so verändert, dass sie in der Lage sind, das funktionierende unspezifische Immunsystem - insbesondere NK-Zellen und Makrophagen - der SCID-Mäuse zu aktivieren.

25

Vor allem die Heraufregulierung des Monokins TNF-alpha durch Annexin-beladene apoptotische Zellen (Fig.6, 7) könnte hier für die Aktivierung der NK-Zellen verantwortlich sein. Denn TNF-alpha ist besonders wichtig für die Rekrutierung von NK-Zellen in das Peritoneum, da TNF-alpha-defiziente Mäuse hier einen Mangel zeigen (Smyth, M.J. et al. (1998) *J Exp Med* 9: 1611-1619).

30

Patentansprüche

1. Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems, wobei das Protein
 - a) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül,
oder
 - b) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls umfasst.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Protein an Phosphatidylserin bindet.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei eine Aminosäuresequenz des Proteins der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Stimulierung der Immunantwort durch eine Blockade, Verhüllung, Maskierung und/oder Entfernung von extrazellulärem membranständig lokalisierten Phosphatidylserin bewirkt wird.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Protein zur Bekämpfung von Bakterien, Viren, Parasiten oder Tumoren verwendet wird.

5 8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Protein als Adjuvans, vorzugsweise in der Tumorthherapie, für Tumorstoffe, in der Virustherapie, insbesondere zur Behandlung von Retrovirusinfektionen, Lentivirusinfektionen, Infektionen mit *Treponema pallidum*, *Sindbisvirus*, *Trypanosoma*
10 *brucei* und HIV-Infektionen und zur Behandlung der Malaria sowie in der Malariaimmunisierung, verwendet wird.

9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.
15

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen sind.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Apoptose und/oder Nekrose durch Bestrahlung der Tumorzellen ex-vivo oder in-vivo ausgelöst wird.
20

12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, wobei die Apoptose und/oder Nekrose durch Inkontaktbringen der Tumorzellen mit Zytostatika ausgelöst wird.
25

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt gebracht werden.

30 14. Medikament zur Stimulierung des angeborenen unspezifischen Immunsystems mit einem Protein, welches

a1) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül, oder
35

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls

und

5

bb) apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

15. Medikament nach Anspruch 14, wobei das Protein an Phosphatidylserin bindet.

10

16. Medikament nach Anspruch 14 oder 15, wobei eine Aminosäuresequenz des Proteins der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%,
15 ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

17. Medikament nach Anspruch 14 bis 16, wobei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

20

18. Medikament nach Anspruch 17, wobei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

19. Medikament nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei es
25 weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.

20. Medikament nach Anspruch 19, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen sind.

30 21. Medikament nach einem der Ansprüche 19 oder 20, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt sind.

22. Verfahren zur Herstellung des Medikaments nach einem der Ansprüche 14 bis 21, wobei apoptotische und/oder nekrotische

Tumorzellen in Kontakt gebracht werden mit einem Protein, welches

5 a) Annexin V oder ein damit weitgehend ähnliches Molekül,
oder

b) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weitgehend ähnlichen Moleküls umfasst.

10 23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Protein an Phosphatidylserin bindet.

15 24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei eine Aminosäuresequenz des Proteins der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

20 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

25 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei die Apoptose und/oder Nekrose durch Bestrahlung der Tumorzellen ex-vivo oder in-vivo ausgelöst wird.

30 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei die Apoptose und/oder Nekrose durch Inkontaktbringen der Tumorzellen mit Zytostatika ausgelöst wird.

35 29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28, wobei das Protein durch Expression mittels transformierten Stämmen von

Escherichia coli und anschließende Reinigung hergestellt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei der transformierte
5 Stamm von *Escherichia coli* *Escherichia coli* BL21 (DE3) ist.

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, wobei als Expressi-
onsplasmid pDJ2-AnXV verwendet wird.

10 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die
Reinigung des exprimierten Annexin V mittels Säulenchromato-
graphie erfolgt.

15 33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Säulenchromatogra-
phie unter Verwendung eines Salz-Gradienten durchgeführt
wird.

1/8

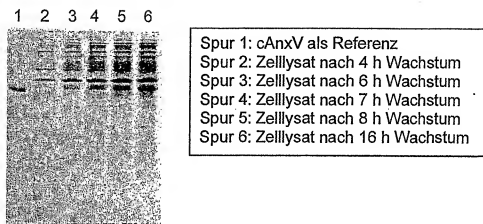


Fig. 1

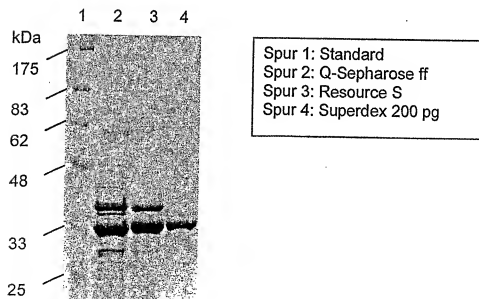


Fig. 2

2/8

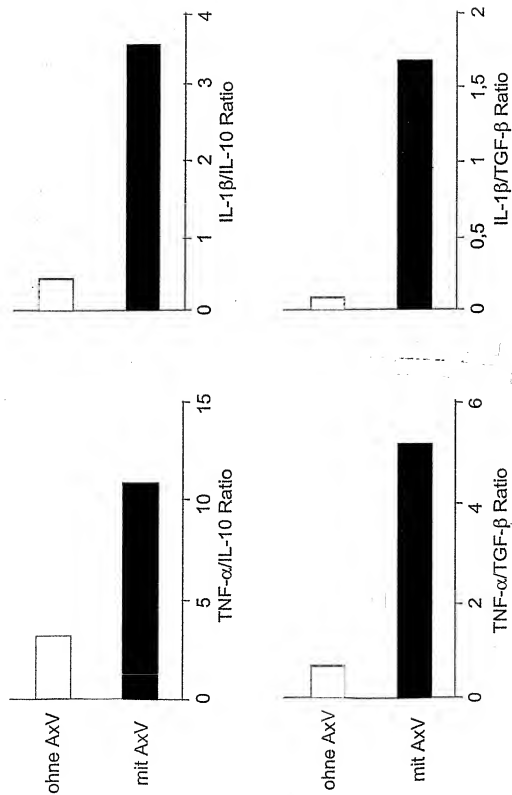


Fig. 3

3/8

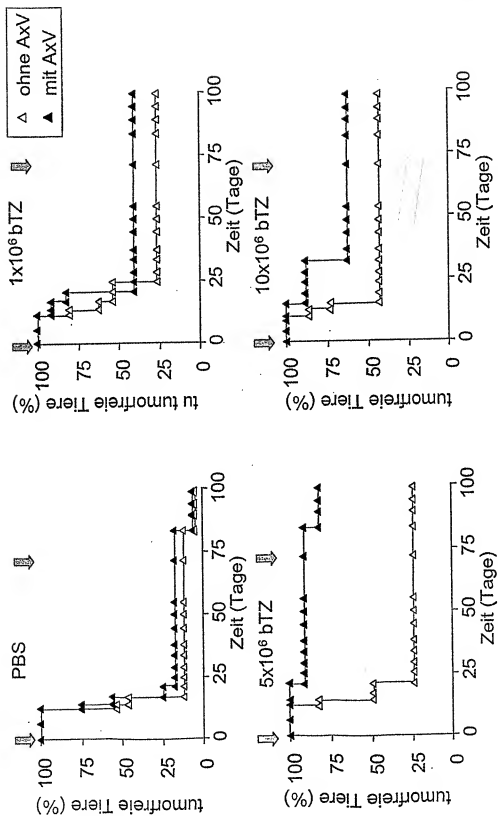


Fig. 4a

4/8

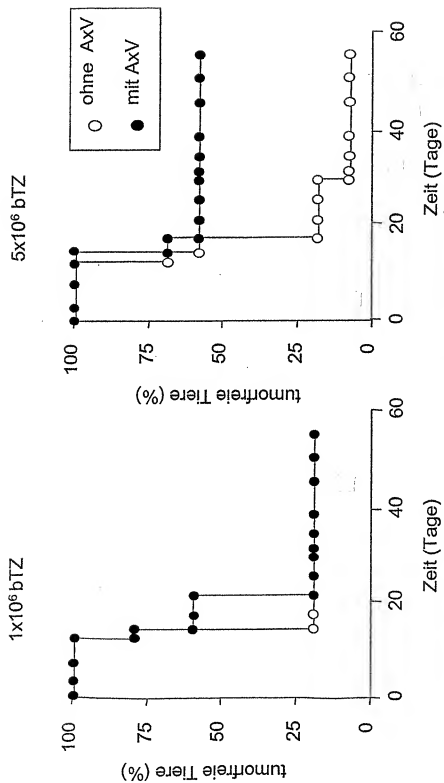


Fig. 4b

5/8

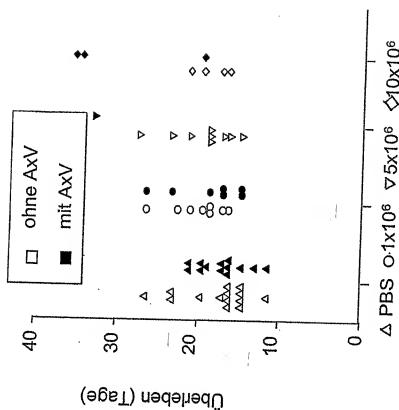


Fig. 5a

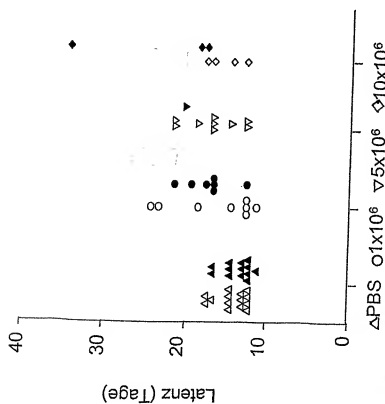


Fig. 5b

6/8

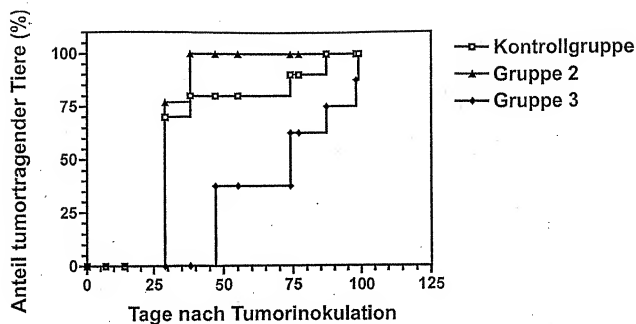


Fig. 6

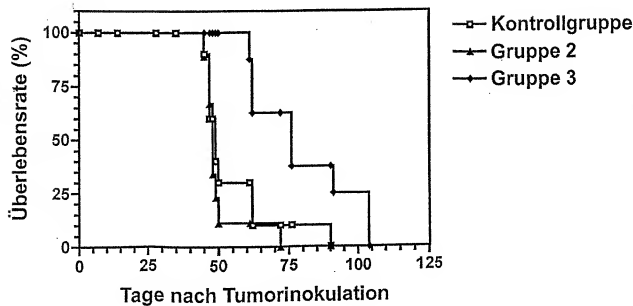


Fig. 7

7/8

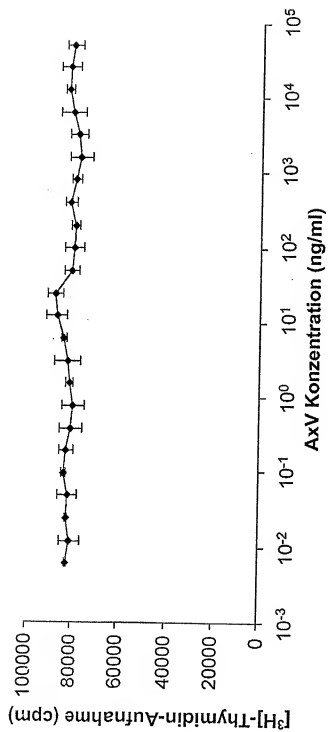


Fig. 8

8/8

Kontrollgruppe**10 Tiere**

Tier Nr.	Auftreten des Tumors	Todestag	Gewicht des Tiers	Tumor-masse	Aszites-bildung	Ausbreitung des Tumors
1	d 29	d 45	19,5 g	4,0 g	0 ml	A
2	d 29	d 47	18,4 g	2,7 g	0 ml	A
3	d 29	d 47	17,4 g	2,2 g	0 ml	A
4	d 29	d 47	20,4 g	2,9 g	0 ml	A
5	d 29	d 49	21,0 g	4,8 g	0 ml	A
6	d 29	d 49	19,8 g	3,0 g	0 ml	A
7	d 29	d 50	18,6 g	2,5 g	0 ml	A
8	d 38	d 62	+ n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	d 55	d 62	23,3 g	4,6 g	1,2 ml	B
10	d 77	d 90	31,5 g	1,8 g	1,2 ml	B

Gruppe 2**9 Tiere**

Tier Nr.	Auftreten des Tumors	Todestag	Gewicht des Tiers	Tumor-masse	Aszites-bildung	Ausbreitung des Tumors
1	d 29	d 45	16,2 g	2,3 g	0 ml	A
2	d 29	d 47	16,8 g	3,6 g	0 ml	A
3	d 29	d 47	17,4 g	3,5 g	0 ml	A
4	d 29	d 48	21,3 g	4,0 g	0 ml	A
5	d 29	d 48	17,3 g	2,7 g	0 ml	A
6	d 29	d 48	17,8 g	4,1 g	0 ml	A
7	d 29	d 49	14,4 g	4,2 g	0 ml	B
8	d 38	d 50	15,9 g	2,6 g	0 ml	B
9	d 38	d 72	30,2 g	3,5 g	4,0 ml	B

Gruppe 3**8 Tiere**

Tier Nr.	Auftreten des Tumors	Todestag	Gewicht des Tiers	Tumor-masse	Aszites-bildung	Ausbreitung des Tumors
1	d 47	d 61	24,5 g	5,2 g	3,5 ml	B
2	d 47	d 62	21,5 g	6,0 g	1,0 ml	B
3	d 47	d 62	24,2 g	1,0 g	2,5 ml	B
4	d 74	d 76	28,8 g	2,9 g	3,2 ml	B
5	d 74	d 76	+ n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	d 87	d 91	33,3 g	3,8 g	3,4 ml	B
7	d 98	d 104	34,3 g	4,2 g	4,2 ml	B
8	d 99	d 104	+ n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

A: intraperitoneal wachsender, weitgehend lokal begrenzter Tumor

B: sichtbare Infiltration des intraperitonealen Tumors in Leber und Milz

n.d.: nicht bestimmt

d n: Tag n, Tag nach Inokulation

SEQUENZPROTOKOLLE

<110> november AG, Gesellschaft für Molekulare Medizin

5 <120> Verwendung eines Proteins zur Herstellung eines
Medikaments zur Stimulierung einer inflammatorischen
zellulären Immunantwort

<130> 411814GA

10

<140>

<141>

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 321

20

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<300>

25 <400> 1

Met Ala Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr Ala Phe Ser Pro Phe Asp

1

5

10

15

Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly

30

20

25

30

Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala

35

40

45

35 Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp

50

55

60

Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu
 65 70 75 80

5

Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu
 85 90 95

Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu

10

100

105

110

Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val
 115 120 125

15

Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu
 130 135 140

Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn
 145 150 155 160

20

Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp Glu Ala Leu Val Glu Lys Asp Ala
 165 170 175

Gln Val Leu Phe Arg Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu
 180 185 190

25

Thr Phe Ile Thr Ile Leu Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg
 195 200 205

30

Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr
 210 215 220

Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asp Leu Glu Lys Leu Leu Leu Ala Val
 225 230 235 240

35

Val Lys Cys Ile Arg Ser Val Pro Ala Tyr Phe Ala Glu Thr Leu Tyr
 245 250 255

5 Tyr Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp Asp Thr Leu Ile Arg Val
 260 265 270

Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg His Glu Phe
 275 280 285

10 Arg Lys Asn Phe Ala Lys Ser Leu Tyr Gln Met Ile Gln Lys Asp Thr
 290 295 300

Ser Gly Asp Tyr Arg Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Asp Asp
 305 310 315 320

15 Glu

20 <210> 2
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

25 <400> 2
 Met Ala Ala Phe Ser Pro Phe Asp Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu
 1 5 10 15

30 Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys
 20 25 30

Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala
 35 40 45

35 Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu

	50	55	60
	Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala		
	65	70	75 80
5	Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly		
	85	90	95
	Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala		
10	100	105	110
	Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn		
	115	120	125
15	Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu		
	130	135	140
	Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp		
	145	150	155 160
20	Glu Ala Leu Val Glu Lys Asp Ala Gln Val Leu Phe Arg Ala Gly Glu		
	165	170	175
	Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Thr Phe Ile Thr Ile Leu Gly Thr		
25	180	185	190
	Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile		
	195	200	205
30	Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asp		
	210	215	220
	Leu Glu Lys Leu Leu Leu Ala Val Val Lys Cys Ile Arg Ser Val Pro		
	225	230	235 240
35			

Ala Tyr Phe Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr
245 250 255

5 Asp Asp Asp Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp
260 265 270

Leu Leu Asp Ile Arg His Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Lys Ser Leu
275 280 285

10 Tyr Gln Met Ile Gln Lys Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Arg Lys Ala Leu
290 295 300

Leu Leu Leu Cys Gly Gly Asp Asp Glu
305 310

15